

# DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS PRINCIPAIS VIROSES E NOVAS DOENÇAS EM CANA-DE-AÇÚCAR

MARINA M. M. **SENGER**<sup>1</sup>; HAIKO E. **SAWAZAKI**<sup>2</sup>; CASSIARA R. N. **GONÇALVES**<sup>3</sup>;  
VIRGÍNIA C. **CARVALHO**<sup>1</sup>; DENISE N. M. **FERREIRA**<sup>4</sup>; VERA L.P. **POLEZ**<sup>4</sup>;  
RENATO F. A. **VEIGA**<sup>5</sup>

Nº 10131

## RESUMO

Uma das principais culturas do Brasil é a de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e, sendo o país com maior produção mundial de açúcar e álcool, é importante a detecção precoce de doenças para auxiliar o processo de obtenção de mudas sadias. A doença “Amarelinho”, causada pela espécie de luteovirus ScYLV (*Sugarcane Yellow Leaf Vírus*), faz com que ocorra o amarelecimento das nervuras foliares enquanto a lâmina foliar continua ainda verde, encurtamento de internódio, amarelecimento e necrose foliar, porém, o amarelecimento pode ser causado por vários fatores, ou pode mesmo não ocorrer sintomas. Já os sintomas do mosaico, espécie de potyvirus SCMV (*Sugarcane Mosaic Vírus*) do mosaico da cana-de-açúcar, além de similar ao de outras doenças, também pode ser assintomático. São também importantes as análises, de doença ainda não existente no Brasil que pode causar grande prejuízo, para prevenção da introdução, como o fijivirus, denominado fiji leaf gall, já detectado em vários países; ou doença recém detectada, para auxílio de monitoramento e controle, como a ferrugem laranja causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (Krug.) Butl, principalmente porque no Brasil, em cana-de-açúcar, já existem os fungos da ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd.) e do carvão (*Ustilago scitaminea*/*Sporisorium scitamineum*). Foram utilizadas folhas de plântulas desenvolvidas a partir de cultura de tecido com cerca de 2 meses de transplante, ou folhas ou DNA amplificado de plantas infectadas cedidas pelo CTC. A extração de DNA foi feita com o método CTAB modificado, e a extração de RNA total com o reagente TRI. Foram utilizados iniciadores da literatura (mosaico e amarelinho) ou desenvolvido pelo laboratório (ferrugem laranja). Os fragmentos amplificados de cada doença foram clonados e a identidade das sequências confirmadas por BLAST. A detecção de infecção de mosaico e amarelinho confirma a eficácia da metodologia em plântulas com 2 meses de transplante. O iniciador desenvolvido foi específico para ferrugem laranja não detectando a ferrugem marrom. As amplificações dos fragmentos clonados de fijivirus embora maiores que o esperado, foram positivamente

confirmadas por BLAST. As sequências dos fragmentos amplificados de fijivirus foram utilizadas para desenvolvimento de iniciadores que deram boa detecção em reações de PCR Real time com amostras clonadas.

- 
1. BOLSISTA CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUC-Campinas, Campinas-SP, ✉ marinasenger@hotmail.com
  2. ORIENTADOR: Pesquisador, IAC, Campinas-SP
  3. Colaborador: Pesquisador, CTC, Piracicaba, SP
  4. Colaborador: Pesquisador, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF
  5. Colaborador: Pesquisador, IAC, Campinas, SP

## ABSTRACT

One of the main crops in Brazil is the sugarcane (*Saccharum* spp.) and being the country the world's largest producer of sugar and alcohol, it is important for the process to obtain healthy seedlings, methods to detect diseases early. The "sugarcane yellow" disease is caused by species of luteovirus ScYLV (Sugarcane Yellow Leaf Virus), and causes yellowing of the veins while the leaf remains green, internodal shortening, leaf yellowing and necrosis, although the yellowing can be caused by several factor, or even no symptom can be observed. The symptoms of mosaic disease, type of SCMV potyvirus (Sugarcane Mosaic Virus) of mosaic and similar to other illnesses, can also be asymptomatic. It is also important the analysis of illness that is not yet present in Brazil, and can cause major damage, to prevent the introduction, as fijivirus called Fiji leaf gall, already detected in several countries; or newly discovered disease, to help the monitoring and control, such as orange rust caused by *Puccinia kuehnii* (Krug.) Butler, mainly because in Brazil, there are already the brown rust fungus (*Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd.) and rust coal (*Ustilago scitaminea* / *Sporisorium scitamineum*). The samples were leaves from seedlings developed from tissue culture with about 2 months after transplanting, or leaves or DNA amplified from infected plants provided by the CTC. DNA extraction was performed using a modified CTAB method and total RNA extraction with TRI reagent. The primers used for mosaic and yellow sugarcane were from literature and for rusty orange developed in laboratory. The amplified fragments from each disease were cloned and the identity of the sequences confirmed by BLAST. The observed amplifications from mosaic and yellow sugarcane confirmed the methodology efficacy for 2 months seedlings. The developed primer was specific for rust orange, do not detecting the rust brown. The amplifications for the cloned fijivirus fragments, although higher than expected, was positively confirmed by BLAST. Sequences of amplified fragments for fijivirus were used to develop primers that gave good detection by Real Time PCR reactions.

## INTRODUÇÃO

A cultura da cana de açúcar é especialmente vulnerável a doenças por causa de vários fatores como propagação por toletes, que facilita a disseminação dos patógenos (mesmo infectados os colmos podem não apresentar sintomas), monoculturas em grandes áreas facilitando as epidemias, contaminação na colheita pelos instrumentos de corte. Como prevenção a doenças, o instituto agrônômico possui o setor de quarentena de mudas, que precisam ser analisadas como livres de fungos, vírus e bactérias. A metodologia mais fácil para detecção de infecção por fungos é o visual, porém, para vírus e bactérias, análises mais detalhadas são necessárias, sendo as de maior sensibilidade e especificidade as moleculares. Dentre as doenças mais importantes em cana-de-açúcar, são conhecidas as viroses causadas pela espécie de luteovirus ScYLV (*Sugarcane Yellow Leaf Vírus*), agente causal do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar ou “Amarelinho” residente no floema, e a espécie de potyvirus SCMV (*Sugarcane Mosaic Vírus*) do mosaico da cana-de-açúcar, assim como as causadas por fungo como o carvão (*Ustilago scitaminea*). A detecção visual de viroses não é confiável. O amarelinho geralmente causa na planta de cana-de-açúcar o amarelecimento das nervuras foliares enquanto a lâmina foliar continua ainda verde, encurtamento de internódio, amarelecimento e necrose foliar, sendo que o amarelecimento pode ser causado por vários outros fatores, ou pode mesmo não causar sintomas (Chatenet et al, 2001). Já os sintomas do mosaico, além de serem causados por outras doenças, também pode ser assintomático (Xu et al, 2008). amarelinho (Chatenet et al, 2001; Parmessur, et al, 2002). São também importantes as análises de doenças, ainda não existente no Brasil que pode causar grande prejuízo, como o fijivirus denominado fiji leaf gall, já detectado em vários países, como método preventivo de introdução, ou de doenças recém detectada como a ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehni*).

O objetivo desse trabalho foi definir e otimizar os protocolos de análises moleculares para as principais viroses da cana-de-açúcar causadas pela espécie de luteovirus ScYLV (*Sugarcane Yellow Leaf Vírus*), agente causal do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar ou “Amarelinho”, a espécie de potyvirus SCMV (*Sugarcane Mosaic Vírus*) do mosaico da cana-de-açúcar, e o fijivirus denominado fiji leaf gall, assim como para a recém introduzida ferrugem causada pelo fungo *Puccinia kuehni*, agente causal da ferrugem alaranjada

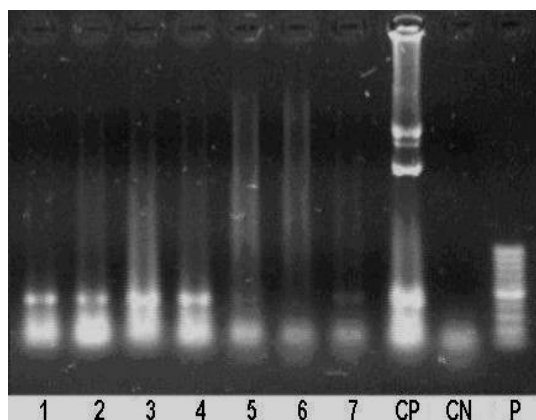
## MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de cana-de-açúcar utilizadas foram desenvolvidas de plântulas originadas por cultura de tecido, com cerca de 2 meses de transplante em casa-de-vegetação no

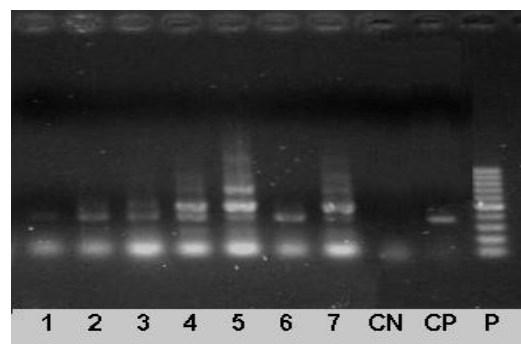
Quarentenário no Instituto Agronômico de Campinas, ou fornecidas pelo Centro de Tecnologia Canaveira de Piracicaba. A extração de DNA foi realizada através do método CTAB de Doyle & Doyle (1990) modificado, e a extração de RNA total com o reagente TRI (Ludwigbiotec). O cDNA foi obtido pelo kit GeneAmp RT-PCR (Applied Biosystems). Foram utilizados os iniciadores de Smith & Van de Velde (Plant Disease, 78:557-560-1994) para mosaico (359pb) e fiji (450pb) e, Gonçalves MC et al (2002) para amarelinho (449pb). Para ferrugem laranja foram utilizados os iniciadores Rust2 (GATGAAGAACACAGTGAAA) e LR6 (CGCCAGTTCTGCTTACC) de Aime, C.A. (2006) e os desenvolvidos pelo laboratório, senso **RORF**:5'-CCT TAG TAA CGG CGA GTG AA-3' e antisenso **RORR**:5'-AGA CTG GTC AAT GGT GCT CC-3' para 754pb, tendo sido utilizadas três amostras de plantas com sintomas de ferrugem coletadas na região de Piracicaba (SP), sendo uma com os sintomas de ferrugem marrom e duas com a da ferrugem laranja. As PCRs foram feitas de acordo com a metodologia do laboratório. Os fragmentos amplificados de cada doença foram clonados em PGEm-T e a identidade das seqüências confirmadas por BLAST.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram observadas as amplificações esperadas de amostras de plântulas de cana-de-açúcar de 350pb para o PCR de mosaico (Figura 1) e 449pb para o amarelinho (Figura 2).

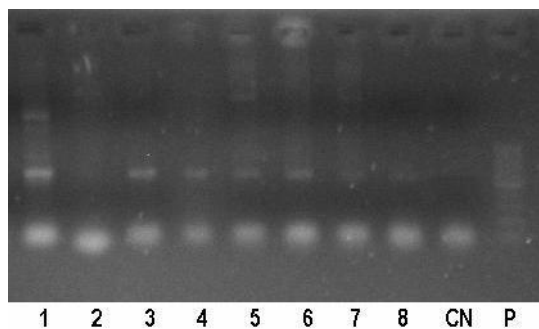


**FIGURA 1.** Amplificação de plântulas de cana-de-açúcar(1 a 7) infectadas com mosaico; CP: controle positivo; CN: controle negativo; P: padrão de 100pb (fermentas)

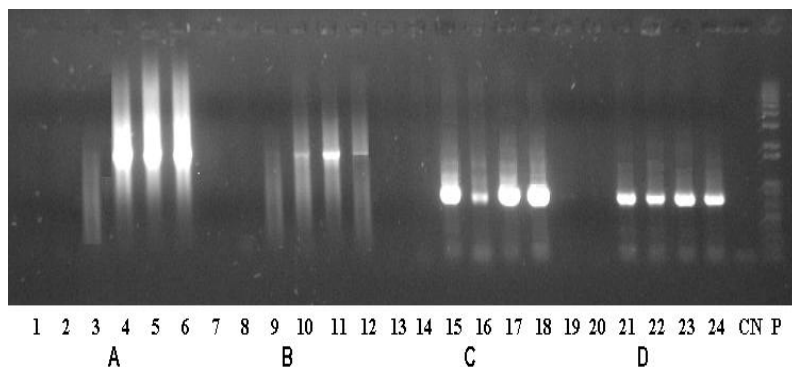


**FIGURA 2.** Amplificação de plântulas de cana-de-açúcar (1 a 7) infectadas com amarelinho; CP: controle positivo; CN: controle negativo; P: padrão de 100pb (fermentas)

As amplificações dos fragmentos clonados de fijivirus (Figura 3) embora maiores que o esperado, foram positivamente confirmadas por BLAST. As seqüências dos fragmentos amplificados de fijivirus foram utilizadas para desenvolvimento de indicadores que deram boa detecção em reações de PCR Real time.



**FIGURA 3.** Amplificação de clones de fijivirus (1 a 8); CN: controle negativo; P: padrão de 100pb (Fermentas)



**FIGURA 4.** Perfil de amplificação por PCR em plantas de cana-de-açúcar, sendo uma com sintomas de infecção por ferrugem marrom (1 e 2; 7 e 8; 13 e 14; 19 e 20) e duas por ferrugem laranja (3 a 6; 9 a 12; 15 a 18; 21 a 24). A e B: reação de 15 e 25 µl com os primers Rust2/LR6 (Aime, CA, 2006); C e D: reação de 15 e 25 µl com os iniciadores desenvolvidos no laboratório RORF /RORR; CN: controle negativo; P: 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen)

Foram observadas amplificações dos fragmentos (Figura 4), por ambas reações de PCR de 15 e 25 µl e para ambos os iniciadores Rust2/LR6 e RORF /RORR, com os respectivos comprimentos esperados de 1400pb e 754pb, somente para as plantas com sintomas de ferrugem laranja. Nenhuma amplificação foi observada para as plantas infectadas com ferrugem marrom, indicando a especificidade dos iniciadores. Verificou-se que o iniciador desenvolvido apresentou maior homogeneidade de observação dos fragmentos amplificados com as diferentes alíquotas de DNA, indicando maior facilidade para amplificação.

## CONCLUSÕES

1. Viroses podem ser detectadas por análise de PCR em plântulas de cana-de-açúcar com 2 meses de plantio.
2. Clones de fragmentos amplificados de fijivirus podem ser utilizados para testes iniciais de reações de PCR Real Time.
3. O iniciador desenvolvido foi específico para a ferrugem laranja

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq /MAPA Edital nº 64/2008 pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, H.H; SCHENCK, S. PCR amplification from a homolog of the be Mating-type gene as a sensitive assay for the presence of *Ustilago scitaminea* DNA. **Plant Disease**, 80(10): 1189- 1192, 1996.
- CHATENET, M; DELAGE, C; RIPOLLES, M. Detection of Sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. **Plant Disease**, 85(11): 1177-1180, 2001.
- DAVIS, M.J; RORR,P; ASTUA-MONGE, G. Nested multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* subsp. Wyli and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. Cong. **Plant Pathology**, ISPP, Edinburg, aug. Offered papers abstract, v.3, 3.3.4, 1998.
- FEGAN, M; CROFT, B.J; TEAKLE, D.S; HAYWARD, A.C. & SMITH, G.R. Sensitive an specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. Xyli, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, 47:495-504, 1998.
- PAN, Y.B; GRISHAM, M.P & BURNER, D.M. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, 81(2): 189-194, 1997.
- PARMESSUR, Y; ALJANABI,S; SAUMTALLY,S &DOOKUN-SAUMTALLY. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellow phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**. 51: 561-566, 2002.
- SMITH, G.R & VAN DE VELDE, R. Detection of sugarcane mosaic virus and Fiji disease virus in diseased sugarcane using the polymerase chain reaction. **Plant Disease**. 78:557-561,1994.